

学校编码: 10384

分类号____密级____

学 号: 32320111153295

UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

刺槐素靶向 RAR γ 调控 AKT-p53 信号通路的抗癌机制

The Anticancer Mechanism of Acacetin Targeting RAR γ
and Regulating AKT-p53 Signal Pathway

曾文军

指导教师姓名: 曾锦章教授

专 业 名 称 : 化学生物学

论文提交日期: 2014 年 5 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

| | |
|------------------------------|----|
| 摘要..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| 第一章 前言..... | 3 |
| 1 核受体..... | 3 |
| 1.1 核受体概述..... | 3 |
| 1.2 核受体分类..... | 4 |
| 1.3 核受体的结构和功能..... | 4 |
| 1.4 核受体与靶点药物开发..... | 6 |
| 2 视黄酸受体 RARs..... | 7 |
| 2.1 视黄酸受体 RARs 的结构与分类..... | 7 |
| 2.2 视黄酸受体 RARs 的转录激活调控..... | 8 |
| 2.3 视黄酸受体 RARs 的非基因型调控..... | 10 |
| 2.4 视黄酸受体 RARs 与肿瘤..... | 11 |
| 3 AKT 和 P53 信号通路..... | 12 |
| 3.1 AKT 信号通路..... | 12 |
| 3.2 p53 信号通路..... | 14 |
| 3.3 AKT 和 p53 信号通路的交互调控..... | 16 |
| 4 刺槐素与肿瘤治疗..... | 17 |
| 5 本文研究的目的和科学意义..... | 18 |
| 第二章 材料与方法..... | 20 |
| 1 实验材料..... | 20 |
| 1.1 细胞株..... | 20 |
| 1.2 宿主细菌..... | 20 |
| 1.3 表达载体..... | 20 |
| 1.4 主要试剂..... | 20 |
| 1.5 主要仪器..... | 21 |
| 1.6 主要溶液..... | 22 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 2 实验方法 | 24 |
| 2.1 细胞培养 | 24 |
| 2.2 GST 蛋白诱导及提取 | 25 |
| 2.3 配体结合试验 | 26 |
| 2.4 荧光共振能量转移检测蛋白和药物的结合 | 27 |
| 2.5 分子对接和分子动力学模拟 | 27 |
| 2.6 报告基因技术 | 28 |
| 2.7 MTT 实验检测细胞的生长抑制 | 28 |
| 2.8 克隆形成实验 | 29 |
| 2.9 流式细胞仪检测凋亡 | 29 |
| 2.10 蛋白样品的制备与 Western Blotting | 30 |
| 2.11 免疫荧光染色 | 31 |
| 2.12 细胞转染（脂质体法） | 31 |
| 2.13 RT-PCR | 32 |
| 2.14 统计学分析 | 33 |
| 第三章 实验结果与分析 | 34 |
| 1 刺槐素是 RAR γ 的拮抗剂 | 34 |
| 2 刺槐素与 RAR γ 特异性结合 | 35 |
| 2.1 刺槐素体外与 RAR γ 特异性结合 | 35 |
| 2.2 刺槐素体内与 RAR γ 结合 | 36 |
| 2.3 计算机模拟刺槐素与 RAR γ 的结合 | 38 |
| 3 刺槐素特异性地诱导 RAR γ 降解 | 39 |
| 4 刺槐素对高表达 RAR γ 的癌细胞具有很好的抗癌活性 | 41 |
| 5 刺槐素调控 AKT、p53 和 Bax 的活性 | 43 |
| 6 刺槐素诱导 p53 上调和 Bax 激活依赖于 AKT 的失活 | 44 |
| 7 RAR γ 调控 AKT-p53 信号通路 | 46 |
| 第四章 讨论 | 47 |
| 第五章 结论 | 50 |

| | |
|----------------|----|
| 参考文献..... | 51 |
| 致谢..... | 63 |
| 硕士期间发表文章 | 64 |

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

| | |
|--|-----------|
| Abstract in Chinese..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| Chapter I Preface..... | 3 |
| 1 Nuclear receptor | 3 |
| 1.1 Brief on Nuclear receptor | 3 |
| 1.2 Classification of Nuclear receptors | 4 |
| 1.3 Structure and function of Nuclear receptors | 4 |
| 1.4 Nuclear receptor-targeted drugs | 6 |
| 2 Retinoic acid receptor (RAR) | 7 |
| 2.1 Structure and function of RARs | 7 |
| 2.2 Genomic function of RARs | 8 |
| 2.3 Nongenomic function of RARs | 10 |
| 2.4 RARs and tumor | 11 |
| 3 AKT and p53 signaling pathway | 12 |
| 3.1 AKT signaling pathway | 12 |
| 3.2 P53 signaling pathway | 14 |
| 3.3 Cross-talk between AKT and p53 signaling pathways | 16 |
| 4 Acacetin and oncotherapy | 17 |
| 5 Aim and scientific significance of this study | 18 |
| Chapter II Materials and Methods..... | 20 |
| 1 Materials..... | 20 |
| 1.1 Cell lines | 20 |
| 1.2 Bacterial strains | 20 |
| 1.3 Plasmids..... | 20 |
| 1.4 Reagents | 20 |
| 1.5 Apparatus | 21 |
| 1.6 Solutions | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 2 Methods | 24 |
| 2.1 Cell culture | 24 |
| 2.2 Induction and extraction of GST-protein..... | 25 |
| 2.3 Competitive ligand binding assay | 26 |
| 2.4 Fluorescence Quenching | 27 |
| 2.5 Molecular docking and molecular dynamics (MD) simulations | 27 |
| 2.6 Reporter assays | 28 |
| 2.7 The growth inhibition measuring with MTT | 28 |
| 2.8 Colony formation assay | 29 |
| 2.9 Flow Cytometric Analyses of Apoptotic Cells | 29 |
| 2.10 Preparation of protein samples and Western Blotting | 30 |
| 2.11 Immunofluorescence Microscopy | 31 |
| 2.12 Cell Transfection | 31 |
| 2.13 RT-PCR..... | 32 |
| 2.14 Statistical analysis | 33 |
| Chapter III Results and Analysis | 34 |
| 1 Acacetin Acts as an Antagonist for RARγ | 34 |
| 2 Acacetin binds to RARγ | 35 |
| 2.1 Acacetin binds to RAR γ in vitro | 35 |
| 2.2 Acacetin binds to RAR γ in vivo | 36 |
| 2.3 Computational simulation of the interaction of acacetin and RAR γ | 38 |
| 3 Acacetin induces RARγ degradation | 39 |
| 4 Acacetin has good antitumor activity to cancer cells with high expression of RARγ..... | 41 |
| 5 Acacetin regulates the activity of AKT, p53 and Bax | 43 |
| 6 Acacetin-induced p53 and Bax is associated with its inactivation of AKT | 44 |
| 7 AKT-p53 network is regulated by RARγ | 46 |
| Chapter IV Discussion | 47 |
| Chapter V Conclusion | 50 |

| | |
|------------------------------|-----------|
| References..... | 51 |
| Acknowledgments | 63 |
| Publications | 64 |

厦门大学博硕士论文摘要库

英文缩略词

| 英文缩写 | 英文全名 | 中文名称 |
|--------------|--|----------------------------|
| NR | nuclear receptor | 核受体 |
| AR | androgen receptor | 雄激素受体 |
| PR | progesterone receptor | 孕激素受体 |
| GR | glucocorticoid receptor | 糖皮质激素受体 |
| MR | mineralocorticoid receptor | 盐皮质激素受体 |
| RXR | retinoid X receptor | 视黄素 X 受体 |
| RAR | retinoic acid receptor | 视黄酸受体 |
| tRXR | N-terminally-truncated RXR α | RXR α 的 N 端切割小片段 |
| TR | thyroid hormone receptor | 甲状腺激素受体 |
| VDR | vitamin D receptor | 维他命 D3 受体 |
| PPAR | Peroxisome proliferator-activated receptor | 过氧化物酶激活受体 |
| DBD | DNA-binding domain | DNA 结合结构域 |
| LBD | ligand-binding domain | 配体结合区 |
| AF | Activation function, | 转录激活功能域 |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium | Dulbecco's 的改良 Eagle's 培养基 |
| ATRA | All-trans-retinoic acid | 全反式视黄酸 |
| 9-cis-RA | 9-cis retinoic acid | 9-顺视黄酸 |
| Cyt c | Cytochrome c | 细胞色素 c |
| PKA | Protein Kinase A | 蛋白激酶 A |
| PKC | Protein Kinase C | 蛋白激酶 C |
| MAPK | Mitogen - Activated Protein Kinase | 促分裂原活化蛋白激酶 |
| p38 | mitogen-activated protein kinases | 丝裂原活化蛋白激酶 |
| JNK | c-Jun N-terminal kinases | c-Jun 氨基末端激酶 |
| PARP | poly ADP-ribose polymerase | 聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 |
| GSK3 β | Glycogen Synthase Kinase 3 β | 糖原合成酶激酶-3 β |
| COXs | Cyclooxygenases | 环氧化酶 |
| PIP2 | phosphatidylinositol 4, 5 biphosphate | |
| PIP | phosphatidylinositol 4 phosphate | |
| PBS | Phosphate-buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |

摘要

视黄酸受体 (RAR α 、RAR β 和 RAR γ) 是核受体超家族中重要的一员, 在细胞生长、增殖、免疫、分化、代谢、凋亡、自噬和自稳态等生物学过程中发挥重要的作用, 是人类实体瘤和血液恶性肿瘤极好的药物治疗靶标。最近, 我们和其他实验室的研究人员已经报道, RAR γ 在多种肿瘤中高度表达, 通过激活 PI3K/AKT 这条生存通路, 扮演促癌蛋白的角色。

在本研究中, 我们进一步研究了 RAR γ 介导的 PI3K/AKT 信号通路在癌细胞中的调节, 并发现了一种活性黄酮类物质刺槐素 (5,7-二羟基-4'-甲氧基黄酮)。刺槐素是从传统中药野菊花 (*Flos Chrysanthemi Indici*) 中分离提取获得, 可以有效地调控 RAR γ /PI3K/AKT 信号通路。我们的研究表明, 刺槐素能特异地结合到 RAR γ , 配体竞争性实验测定其 IC₅₀ 为 12.5 μ M, 并诱导 RAR γ 通过蛋白酶体途径发生降解。刺槐素对 RAR γ 高表达的 HepG2 细胞和 MCF-7 细胞敏感, 而对 RAR γ 低表达的 SW480 细胞不敏感, 意味着刺槐素诱导的癌细胞凋亡依赖于 RAR γ 。有趣的是, 刺槐素以转录拮抗的取向与 RAR γ 结合, 这种结合导致 AKT 活性降低。我们进一步证明, 刺槐素引起的 AKT 失活与 p53 和 Bax 的表达增加紧密相关, 为刺槐素诱导的凋亡提供分子基础。总之, 我们的研究已经证明刺槐素能通过结合 RAR γ , 靶向调控 p53-AKT 信号通路网络, 诱导癌细胞凋亡。黄酮类物质代表一类具有潜在前景的先导化合物, 广泛存在于食物和药用植物, 刺槐素作用靶点和作用机制的阐述将为开发和改进黄酮类药物提供新的理论基础。

关键词: 刺槐素; RAR γ ; p53

Abstract

The nuclear retinoic acid receptors (RAR; α , β , and γ), a key member of nuclear receptor superfamily, play essential roles in regulation of cell growth, proliferation, immune, differentiation, metabolism, apoptosis, autophagy, homeostasis, etc, and are excellent pharmacological targets in human solid and hematological malignancies. We and others have recently reported that RAR γ is overexpressed in several tumors and acts as an oncogenic protein through activation of the PI3K/AKT survival pathway.

In this study, we further investigated the regulation of RAR γ -mediated PI3K/AKT signaling in cancer cells and found that acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone), an active flavonoid compound from traditional Chinese medicine *Flos Chrysanthemi Indici*, could act as a potent modulator of the pathway. We showed that acacetin specifically bound to RAR γ with an IC₅₀ of 12.5 μ M, and it induced cancer cell apoptosis in a RAR γ -dependent manner as HepG2 liver cancer cells as well as MCF-7 breast cancer cells with the high RAR γ expression were sensitivity to the apoptotic effect of acacetin while SW480 colon cancer cells with the low RAR γ expression were not. Interestingly, acacetin bound to RAR γ in a transcriptionally antagonistic orientation and the binding resulted in inactivation of AKT. We further demonstrated that acacetin inactivation of AKT was closely associated with increased p53 expression and activation of Bax, providing a molecular basis for the apoptotic effect of acacetin. Together, our findings demonstrated that acacetin could target p53-AKT network for inducing apoptosis of cancer cells through its binding to RAR γ . Since flavonoids represent potential promising drug leads enriched in food and medicinal plants, identification of the target and action mode of acacetin provide a new basis for developing improved flavonoid-based drugs.

Key words: Acacetin; RAR γ ; p53

第一章 前言

1 核受体

1.1 核受体概述

对核受体的研究始于 20 世纪 60 年代与 70 年代之交。人们观察到类固醇等激素能特异性地结合组织，并引起相应生理性变化。基于此类激素是脂溶性的，可以自由透过细胞膜，人们推测这一生理变化可能是由于激素透过细胞膜，与胞内特定受体结合并进入核内影响靶基因的转录造成的。1974 年，Ashburner 等人观察到蜕皮激素能触发线虫多线染色体的蓬松化(基因转录的染色体特点)^[1]，是这一推测的很好证据。随着实验技术的成熟，Schrader 等人利用放射性标记配体技术分离并纯化到孕激素受体 (pro-gesterone receptor, PR)^[2]。随后，糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR) 等核受体先后被分离出来^[3]。期间，人们还进行核受体活化的一般机制研究，发现配体与相应核受体结合，诱导受体的二聚化，增强了与特定 DNA 序列(激素反应元件, hormone response elements, HREs) 的结合^[4]，最终引发特定靶基因的表达上调。1985 年，糖皮质激素受体的 cDNA 被 Hollenberg 等人^[5]克隆出来。雌激素受体(estrogen receptor, ER)、PR、雄激素受体(andro-gens receptor, AR)、甲状腺激素受体(thyroid hormone receptor, TR)、全反式及 9-顺视黄酸受体(RAR 和 RXR) 以及维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR) cDNA 也很快被克隆出来^[6]。人们对核受体结构和功能的解析也进入到全新时期。早期，对核受体的研究主要集中在核受体的基因型功能，即核受体与 DNA 上相应反应元件的直接相互作用来调控靶基因的表达，也能通过与一些转录因子相互作用，而不通过直接与 DNA 结合来调节基因的表达。然而最近十年，人们发现部分核受体还具有非基因型功能，能够定位到细胞内不同的亚细胞结构上，通过与不同蛋白之间的直接相互作用，快速调控细胞内信号转导通路，发挥广泛的生物学效应。目前普遍认为，核受体 ((nuclear receptor, NR)是一类多细胞生物中含量最丰富的转录因子超家族，能被相应配体及众多共调节因子调节，调控机体的生长发育、细胞分化，以及体内许多生理、代谢过程。

1.2 核受体分类

越来越多的核受体被发现，人们对其进行了分类。根据参与转录调控时二聚化形式与对应 DNA 结合元件的不同分为四大类：Class I, Class II, Class III 与 Class IV^[7]。Class I 核受体形成同源二聚化，对应的 DNA 结合元件反向重复；Class II 核受体与 RXR 结合形成异源二聚体，对应的 DNA 结合元件正向重复；Class III 核受体主要形成同聚物，对应的 DNA 结合元件正向重复；Class IV 核受体则为单体，对应的 DNA 结合元件为 Extended Core Sites。

基于配体的不同，核受体家族可以分为三类：类固醇激素受体家族、非类固醇激素受体家族和孤儿受体家族。雌激素受体（Estrogen Receptor, ER）、雄激素受体（Androgen Receptor, AR）、孕激素受体（Progesterone Receptor, PR）、糖皮质激素受体（Glucocorticoid Receptor, GR）、盐皮质激素受体（Mineralocorticoid Receptor, MR）等属于类固醇激素受体家族；甲状腺激素受体（Thyroid-hormone Receptor, TR）、维甲酸受体（Retinoic Acid Receptor, RAR; Retinoid X Receptor, RXR）、维生素 D₃ 受体（Vitamin D₃ Receptor, VDR）等属于非类固醇激素受体家族；NGFI-B/Nur77、Nurr1、NOR-1、COUP-TF 等到目前为止仍未发现其天然配体，归为孤儿核受体。在人类基因组中，共发现 48 种核受体基因家族，其中 24 种已知其天然配体^[8]。

1.3 核受体的结构和功能

第一个核受体基因被克隆之前，人们就意识到核受体是模块化的蛋白质。核受体一般分为六个区，依次是 A、B、C、D、E 和 F 区，见图 1。A/B 区处于核受体的 N-端，长短不一，保守性最低。它包含一个转录激活域 AF-1（Activation Function-1），AF-1 又包含数个自激活结构域 AD（Autonomous Transactivation Domain）。AF-1 能够被共激活因子或其它转录因子识别，介导配体非依赖性的转录激活。C 区处于核受体的中央，为高度保守的 DNA 结合结构域（DNA-binding domain, DBD），包含两个高度保守的锌指结构。D 区称为绞链区，位于 DNA 结合区（C 区）和配体结合区（E 区）之间，较短且不保守的，还包括部分核定位信号肽 NLS（Nuclear Localization Signal）。该区赋予核受体一定的三维灵活度，能降低配体诱导的核受体变构或空间折叠时所需的生物能耗，使核受体蛋白氮端

与碳端的相互作用成为可能。E 区，即配体结合区 (ligand-binding domain, LBD)，是最大的结构域，整体构架很保守，其序列的部分变化保证了选择型配体的识别。核受体 LBD 的三维结构很相似，由 12 个螺旋组成，其中的 11 个螺旋构成一个配体结合口袋，螺旋 12 (H12) 形成一个可移动的盖子。特异性配体的部分化学结构能够诱导 H12 的构像发生改变，进而调控口袋的开启。此外，E 区还包括第二个 NLS 和转录激活域 AF-2 (Activation Function-2)，介导核受体二聚化以及与其它转录相关蛋白相互作用的重要功能，且 AF-2 介导的转录调节属配体依赖型。有些核受体还包含一个 F 区，位于 C 端，序列高度可变，其结构和功能尚不十分清楚

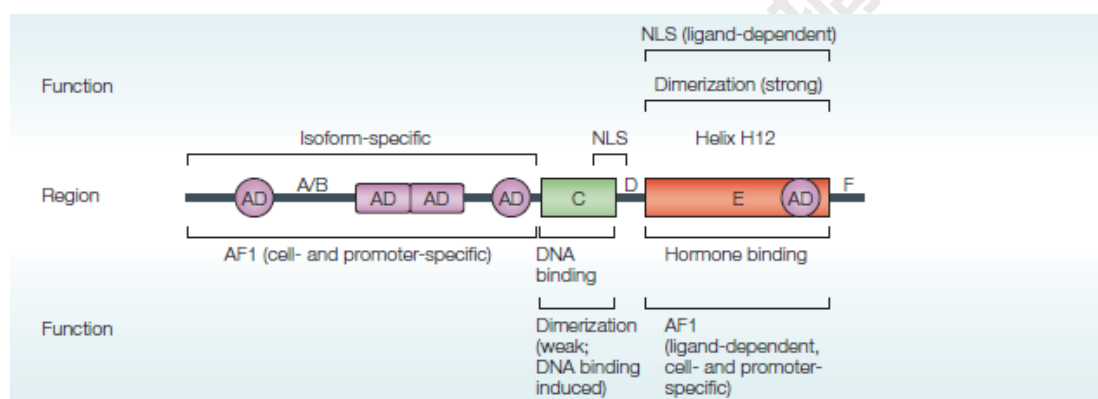


图 1 核受体结构和功能示意^[8,9]

AD: 自激活结构域; NLS: 核定位序列

Fig.1. Structure and function of nuclear receptors

随着核受体三维结构的解析，人们对核受体典型的功能模式也更加清晰，包括抑制、去抑制和转录激活三个步骤^[8,9]。在配体不存在情况下，核受体结合转录辅阻遏因子，如 NCoR1 或 NCoR2，募集包含特定组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 的转录复合物。这些去乙酰化酶能使染色体凝聚，最终抑制靶基因的表达。辅阻遏物能对接到 LBD 表面的疏水凹槽。大多数情况，竞争性配体能促进复合物构象变化，引起 H12 的定位发生改变，破坏凹槽的疏水性，导致辅阻遏物复合物的分离。同时，配体诱导的核受体构象改变，暴露部分的结构能识别并结合第一个共激活复合物。该复合物有组蛋白乙酰转移酶活性 (HAT)，使染色体去凝聚，是靶基因表达的必要非充分条件。随后，乙酰转移酶复合物分离下来，第二个共激活复合物 (TRAP/DRIP/ARC) 组装上去，此刻的核受体才与基础转录复合物

建立联系，启动靶基因的转录。

1.4 核受体与靶点药物开发

核受体作为受体家族中的一大类，能够与相应的配体小分子结合，功能受小分子调控。近些年，孤儿核受体的调节配体也逐渐被人们发现。由于核受体以配体依赖的调控模式参与正常细胞或癌细胞的生物学过程，被认为是癌症预防与治疗药物开发的理想靶点。

针对各种核受体开发的药物已广泛应用于临床，例如：针对雄性激素受体（AR）的 Casodex 用于治疗前列腺癌（Prostate Cancer）、针对雌性激素受体（ER）的 Evista 用于治疗骨质疏松症（Osteoporosis）、针对皮质激素受体（MR）的 Aldactone（MR）用于治疗心脏衰竭（Heart Failure）、针对黄体酮激素受体（PR）的 Mifepristone 作为一种安全的堕胎药（Abortifacient）、针对维生素 D 受体（VDR）的 Dovonex 用于治疗牛皮癣（Psoriasis）、针对甲状腺激素受体（TR）的 Synthroid 用于治疗甲状腺机能减退症（Hypothyroidism）、针对维甲酸受体（RAR）的 Accutane 用于治疗痤疮（Acne）、针对视黄醇受体（RXR）的 Targretin 用于治疗皮肤癌（Skin Cancer）、针对糖皮质激素受体（GR）的 Flonase 用于过敏症（Allergy）的治疗、针对过氧化物酶体增生受体（PPAR）开发的药物 Avandia 用于治疗糖尿病（Diabetes）。

近年来，人们发现食物和药用植物中存在大量的天然产物，而且数量相当可观的天然化合物及其衍生物可以调控核受体的生物学功能。以核受体家族为靶点已成功开发了许多药物，用于治疗癌症、心血管疾病、糖尿病以及脑痴呆等疾病，并广泛用于临床（见表 1）。

表 1 以核受体为靶点从天然产物中发现的新化合物

| 药物 | 化合物 | 核受体 | 治疗病症 |
|---------------------|-----------------|-----|-----------------|
| <i>Rhei rhizoma</i> | Lindleyin | ER | Prostate cancer |
| 人参 | Ginsenoside-Rg1 | ER | Stress |
| 葡萄籽/红酒 | Resveratrol | ER | Cardiovascular |

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库